



TITLE:

# ホヤ初期胚における神経誘導機構 の解析( Digest\_要約 )

AUTHOR(S):

太田, 尚志

---

CITATION:

太田, 尚志. ホヤ初期胚における神経誘導機構の解析. 京都大学, 2013, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2013-11-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17943>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

# 学位申請論文要約

## Analysis of a mechanism for neural induction in ascidian embryos

ホヤ初期胚における神経誘導機構の解析

太田 尚志

### 背景

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は被囊 (尾索) 動物であり、頭索動物と脊椎動物とともに脊索動物を構成している。カタユウレイボヤの幼生は、脊索動物を特徴付ける脊索と背側神経管を有しており、この背側神経管は誘導により外胚葉細胞から分化する。

両生類の神経分化には、腹側領域から分泌される BMP (Bone morphogenetic protein; 骨形成因子) の働きが、オーガナイザーから分泌される BMP アンタゴニスト (Chordin, Noggin, Follistatin など) によって阻害されることを必要とする。また、脊索動物の中で最も初期に分岐した頭索動物のナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) では、BMP アンタゴニストを含むオーガナイザー遺伝子および BMP シグナル遺伝子の構成と発現パターンが、脊椎動物と高度に保存されており、実際に BMP シグナルは背側神経管の形成に関与していることが示されている。このことは、祖先的な脊索動物が BMP シグナルを利用した神経誘導機構を有していた可能性が高いことを示唆している。

一方で、ホヤ胚の神経誘導は 16 細胞期から 32 細胞期の間に起こり、植物極側から分泌される FGF (Fibroblast growth factor; 繊維芽細胞増殖因子) による誘導により、動物極側の一部の割球が神経に運命決定される。先行研究によれば、ホヤ胚の神経誘導には、この FGF のみで十分であり、BMP と BMP アンタゴニストは必要ではないと考えられていた。しかしながら、そうだとすれば、ホヤを含む尾索動物では、脊椎動物の系統から分岐した後、その進化の過程で独自に BMP シグナルを利用した背側神経管をつくる機構を失い、新たに FGF シグナルを利用する機構を獲得したことになる。

この進化発生生物学的なパラドックスを検証するために、本研究では、ホヤの神経誘導の機構を網羅的に調べた。ホヤ胚で神経誘導が起こる時期には 5 つのシグナル分子 [Anti-dorsalizing morphogenetic protein (ADMP; BMP の一種), EphrinA-d, Fgf9/16/20, Gdf1/3-like (BMP ではないものの BMP を含む TGF $\beta$  ファミリーに属する), Wnt-NAe] が発現しており、これら 5 つの分子の働きを統合的に捉えなければ正確な種間の比較はできず、議論に決着をつけることができないと考えたためである。

### 方法

ホヤの神経誘導機構に関与する可能性のあるシグナル分子の機能を解析するために、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて機能阻害をおこなった。ホールマウ

ント *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、実験胚における神経マーカー遺伝子である *Otx* および *Nodal* の遺伝子発現を観察した。また、活性化された ERK の局在を観察するために、抗リン酸化 ERK マウス抗体を用いた免疫染色をおこなった。*Otx* および *Nodal* のシス調節機構を解析するためにレポータ DNA コンストラクトを作製し、エレクトロポレーションにより胚内に導入した。転写された mRNA はホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより確認した。

## 結果

5つの遺伝子の機能阻害実験胚では、*Otx* と *Nodal* の発現に影響が見られた。*Fgf9/16/20* の機能阻害胚では、*Otx* と *Nodal* の発現が消失し、*EphrinA-d* の機能阻害胚では、*Otx* と *Nodal* の発現が異所的に観察された。この異所的な発現には *Fgf9/16/20* が必要であることがわかり、ERK の活性化を抑制することで *Otx* と *Nodal* の発現を調節していることが明らかになった。*Admp* と *Gdf1/3-like* の同時機能阻害胚では、*Otx* と *Nodal* の発現が異所的に観察された。この異所的な発現には *Fgf9/16/20* が必要であることが明らかになり、シス調節機構の解析から、ADMP と *Gdf1/3-like* は転写因子 SMAD を利用したシス調節を介して、FGF9/16/20 シグナルを抑制していることが明らかとなった。*Wnt-NAe* の機能阻害胚では、32 細胞期の動物極側後方の割球の配置に異常が見られた。

## 考察・結論

本研究では、5つのシグナル分子によって活性化される複数のシグナル伝達経路が協調して神経誘導をおこなっていることを明らかにした。ホヤの神経誘導で主な働きをしているのは mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路であり、FGF9/16/20 により活性化され、*EphrinA-d* により抑制される。ADMP と *GDF1/3-like* は、転写因子 SMAD を介して、神経前駆細胞で発現する遺伝子の発現を直接抑制している。この抑制がなければ、微弱に活性化された MAPK 経路でも、しばしば神経誘導が起こってしまう。*Wnt-NAe* は、32 細胞期の動物極側後方の割球の配置を調節している。

本研究の成果は、ホヤの神経誘導機構の包括的な理解を提供する。同時に、ホヤでも脊椎動物と同様に、BMP を利用した神経誘導機構を有していることを示し、祖先的な脊索動物が背側神経管を獲得した時点で BMP シグナルを利用した神経誘導機構を有していた可能性を強く示唆している。